

51 Int Cl<sup>7</sup> : G 01 N 21/64, G 01 N 33/543, 33/551, C 12 Q 1/68,  
B 01 L 3/00, B 82 B 1/00

12

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 05.10.98.

30 Priorité :

43 Date de mise à la disposition du public de la demande : 07.04.00 Bulletin 00/14.

56 Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : Se reporter à la fin du présent fascicule

60 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

71 Demandeur(s) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE Etablissement de caractère scientifique technique et industriel — FR et BIO MERIEUX — FR.

72 Inventeur(s) : IDA MICHEL, FARGEIX ALAIN, PERRAUT FRANCOIS et LAGRANGE ALEXANDRE.

73 Titulaire(s) :

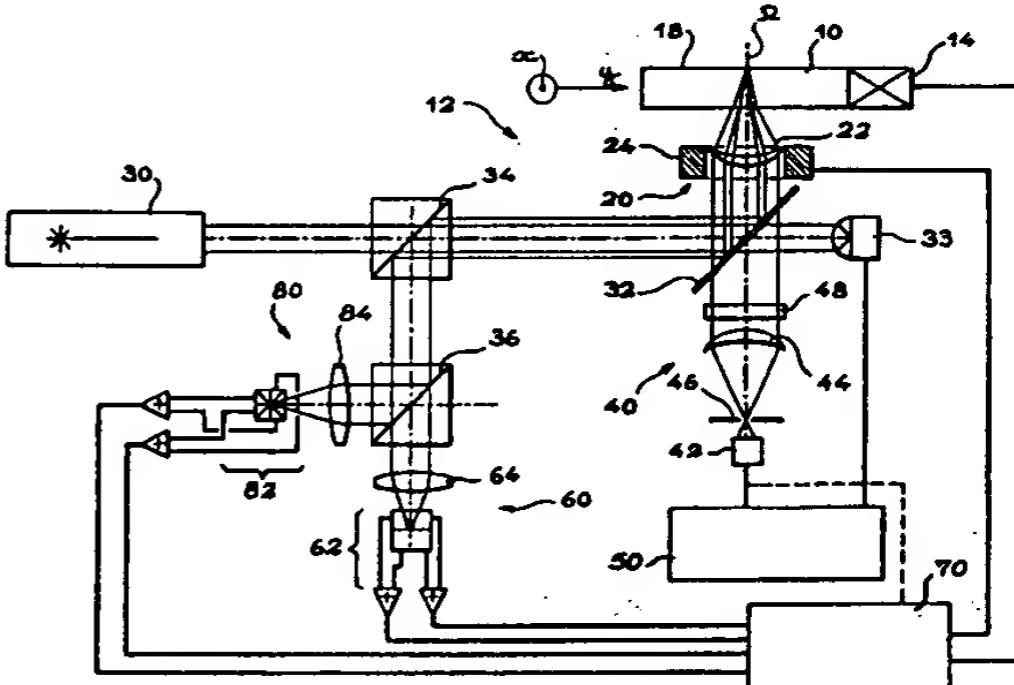
74 Mandataire(s) : BREVATOME.

54 BIOPUCE ET DISPOSITIF DE LECTURE D'UNE BIOPUCE COMPORTANT UNE PLURALITÉ DE ZONES DE RECONNAISSANCE MOLECULAIRE.

57 Dispositif de lecture d'une biopuce (10) comportant une pluralité de zones de reconnaissance moléculaire et une pluralité de repères optiques de position, associés aux zones de reconnaissance, le dispositif comportant :

- une tête optique (20) apte à projeter sur la biopuce une lumière d'excitation,
- des moyens (14) et/ou (24) de déplacement relatif de ladite tête et ladite biopuce,
- un système optique (40) d'analyse, associé à la tête optique pour recevoir une lumière susceptible de provenir des zones de reconnaissance,
- un système optique (60) de positionnement, associé à la tête optique pour recevoir une lumière susceptible de provenir d'au moins une piste de guidage et/ou un repère de position, et
- des moyens (70) d'asservissement du balayage de la tête optique.

Applications à l'analyse biologique et chimique.



BIOPUCE ET DISPOSITIF DE LECTURE D'UNE BIOPUCE  
COMPORTANT UNE PLURALITE DE ZONES DE RECONNAISSANCE  
MOLECULAIRE

Domaine technique

5        La présente invention concerne une biopuce comportant une pluralité de zones de reconnaissance moléculaire et un dispositif de lecture d'une telle biopuce. On entend par biopuce, une puce ou un support présentant à sa surface une ou plusieurs zones, dites 10 zones de reconnaissance, équipées de molécules présentant des propriétés de reconnaissance. Dans la suite du texte, et par abus de langage, le terme biopuce est utilisé indépendamment de la destination de la puce à une analyse chimique ou biologique.

15       Les molécules de reconnaissance peuvent être, par exemple, des oligonucléotides, des polynucléotides, des protéines telles que des anticorps ou des peptides, des lectines ou tout autre système du type ligand-récepteur. En particulier, les molécules de 20 reconnaissance peuvent comporter des fragments d'ADN ou d'ARN.

25       Lorsque la biopuce est mise en contact avec un échantillon à analyser, les molécules de reconnaissance sont susceptibles d'interagir, par exemple par complexation ou par hybridation avec des molécules dites "molécules cibles" de l'échantillon. Ainsi, en équipant une biopuce d'une pluralité de zones de reconnaissance avec différentes molécules de reconnaissance sélectivement sensibles à différentes 30 molécules-cibles, il est possible de détecter et éventuellement de quantifier une grande variété de molécules contenues dans l'échantillon.

Les complexes formés sur la biopuce peuvent être repérés au moyen d'un marquage fluorescent appliqué aux molécules cibles de l'échantillon.

Le dispositif de lecture objet de l'invention 5 est destiné à faciliter l'opération de lecture des molécules marquées, susceptibles d'être présentes dans les zones de reconnaissance d'une puce.

Ainsi, l'invention trouve des applications dans les domaines de l'analyse biologique et chimique.

10 Des applications particulières dans le domaine de l'analyse biologique peuvent être la recherche de polymorphismes et de mutations, le séquençage par hybridation et le suivi de l'expression de gènes.

#### 15 Etat de la technique antérieure

Le nombre de zones de reconnaissance d'une puce est variable en fonction du type d'analyse que l'on souhaite effectuer. Aussi, on distingue les puces dites de "basse densité" qui comportent de quelques dizaines 20 à quelques centaines de zones de reconnaissance et les puces dite de "haute densité" qui peuvent comporter plusieurs milliers à plusieurs centaines de milliers de telles zones.

Sur les puces de haute densité les zones de 25 reconnaissance présentent des tailles réduites. L'extension des zones est en effet inférieure à 100µm, voire inférieure à 10µm.

30 Comme indiqué précédemment, le repérage des complexes formés sur une biopuce fait appel à des marqueurs fluorescents. Les marqueurs, tels que, par exemple, la fluorescéine ou la phycoérythrine, peuvent être couplés directement sur les molécules cibles de l'échantillon à analyser. Les molécules cibles peuvent

aussi être marquées par l'intermédiaire de groupements de reconnaissance indirecte, tels que la biotine ou la digoxigénine par exemple.

Ainsi, lorsque des molécules de reconnaissance 5 d'une zone de reconnaissance donnée ont interagi ou se sont hybridées avec des molécules cibles marquées, le marqueur fluorescent se trouve fixé sur ces zones.

La lecture d'une biopuce comporte l'excitation des marqueurs fluorescents sous l'effet d'une lumière 10 dite lumière d'excitation dirigée sur la puce, et l'enregistrement, pour chaque zone de reconnaissance, de la fluorescence provoquée par la lumière d'excitation.

La détection d'une fluorescence dans une zone 15 de reconnaissance, permet, en connaissant le type de molécule de reconnaissance présente en cette zone, de conclure à la présence dans l'échantillon à analyser de molécules cibles (marquées) susceptibles d'interagir avec la molécule de reconnaissance connue. 20 Eventuellement, l'intensité de la fluorescence peut être mesurée pour en déduire la concentration des molécules cibles concernées de l'échantillon.

A titre d'illustration de ces techniques, notamment dans les domaines de la biologie génétique, 25 on peut se reporter aux documents (2), (3) et (4) dont les références sont précisées à la fin de la présente description.

Pour des biopuces de basse densité, la lecture des zones de reconnaissance peut être effectuée avec 30 des stations d'imagerie équipées de caméras à couplage de charge (CCD). Ces stations sont cependant mal adaptées aux puces à haute densité. En effet, les caméras CCD devraient présenter un nombre considérable

de pixels de détection, et, comme les flux de lumière de fluorescence sont particulièrement faibles pour les puces à haute densité, les caméras devraient de plus être refroidies pour améliorer leur rapport de signal 5 sur bruit.

Ainsi pour les puces de haute densité on fait appel à des scanners à fluorescence permettant de balayer la puce pour en analyser successivement les zones de reconnaissance.

10 Ces scanners sont équipés d'un système optique confocal, associé à un capteur photoélectrique, pour enregistrer la fluorescence de chaque zone. Le scanner permet d'observer des objets avec une très bonne résolution spatiale (de 1 à 10 $\mu$ m) et le système optique 15 confocal permet de s'affranchir des effets d'émissions lumineuses parasites (autofluorescence, réflexion spéculaire,...).

A titre d'illustration d'un scanner pour des puces de haute densité, on peut se reporter au document 20 (1) dont la référence est également indiquée à la fin de la description.

Les scanners à fluorescence délivrent des signaux électriques dont on fait l'acquisition pour former une image, à deux dimensions, de la biopuce. Les 25 signaux sont également exploités pour reconnaître la structure spatiale de la surface de la biopuce et pour repérer et délimiter les zones de reconnaissance qui s'y trouvent.

Enfin, l'intensité du signal pour chaque zone 30 de reconnaissance est enregistrée comme résultat d'analyse.

Ces résultats d'analyse peuvent ensuite faire l'objet d'un traitement informatique adapté pour en

tirer une information biologiquement ou chimiquement pertinente.

Il s'avère que le traitement des signaux indiqué ci-dessus présente l'inconvénient de nécessiter 5 un grand nombre de points de mesure, ou de pixels, pour chaque zone de reconnaissance.

En effet, la délimitation précise de chaque zone de reconnaissance nécessite de disposer d'une densité de pixels-images suffisante pour chaque zone de 10 reconnaissance.

On constate, de façon pratique, que pour effectuer un traitement du signal dans des conditions acceptables, un nombre de pixels de l'ordre de 36 à 64 est nécessaire pour chaque zone de reconnaissance, 15 selon sa taille.

Ainsi, le traitement du signal pour des biopuces de haute densité requiert des moyens informatiques de traitement et de mémorisation considérables. Le traitement est donc coûteux.

20 En outre, la segmentation de l'image selon les zones de reconnaissance n'est pas parfaitement fiable.

Les documents (5) et (6), dont les références sont précisées à la fin de la présente description, décrivent d'autres possibilités de lecture d'une 25 biopuce permettant d'éviter dans une certaine mesure les difficultés ci-dessus.

Le document (5) prévoit de mettre en place sur la puce des éléments de reconnaissance et de repérage permettant de faciliter la lecture, et permettant 30 d'envisager la lecture de biopuces en utilisant des dispositifs de lecture, tels que les lecteurs de disques optiques compacts (CD-ROM).

En effet, dans le document (5), les auteurs décrivent un traitement biochimique de biopuces dans le but de les rendre lisibles sur un dispositif de lecture de diffusion grand public (notamment les 5 lecteurs de disques optiques compacts CD-ROM). Avant l'analyse de l'échantillon contenant les molécules cibles à analyser, les zones de reconnaissance moléculaire de la biopuce sont recouvertes d'une pellicule réfléchissante formée par des billes 10 métalliques ancrées à sa surface par des molécules "ponts". Ces billes réfléchissantes sont fonctionnalisées pour pouvoir également accrocher des molécules cibles de l'échantillon. Durant 15 l'hybridation, une même molécule cible doit donc être accrochée en deux points : d'une part à la surface de la biopuce, sur les zones de reconnaissance moléculaire, et d'autre part sur la surface d'une des billes métalliques située au-dessus de cette zone de reconnaissance. Après hybridation, un traitement 20 chimique approprié casse les molécules ponts ancrant les billes métalliques à la surface, et la surface de la biopuce est rincée. Seules les billes métalliques alors retenues à la surface par un nombre minimum de molécules cibles, restent présentes, et forment autant 25 de "bits" d'information biologique.

Avec le traitement proposé dans le document (5), une étape biochimique supplémentaire est nécessaire à l'analyse. Celle-ci réside dans le clivage des molécules ponts. De plus, l'hybridation des 30 molécules cibles sur les zones de reconnaissance est très ralentie par la présence des billes métalliques qui diminuent considérablement la vitesse de diffusion des molécules cibles vers la surface supportant les

zones de reconnaissance. L'analyse risque donc d'être très lente. En outre, la relation qui existe entre le nombre de billes métalliques restant finalement accrochées à la surface et la concentration initiale de molécules cibles dans l'échantillon, n'est pas une relation permettant une quantification aisée. Il s'agit plutôt d'une relation en marche d'escalier. (Au-dessous d'un seuil, les billes ne restent pas accrochées ; au-delà, elles restent accrochées. La gamme dynamique dans laquelle le nombre de billes restantes est intermédiaire, et donc dans laquelle une quantification est possible, est probablement très faible.)

Selon le document (6), la biopuce est équipée de repères associés aux zones de reconnaissance. Ces repères sont cependant distincts des molécules de reconnaissance et physiquement séparés des zones de reconnaissance. Les repères peuvent être détectés indépendamment d'une réaction d'hybridation ou de complexation lors du balayage de la biopuce.

Dès lors que la position des repères est connue, on peut mesurer le temps écoulé entre la détection successive de deux repères pour établir une fonction reliant la position relative du scanner sur la biopuce. Cette fonction peut servir à déterminer avec plus de précision le lieu des zones de reconnaissance sur la biopuce.

L'utilisation de repères sur la biopuce permet en définitive d'améliorer la localisation des zones de mesure et en faciliter ainsi la lecture.

Toutefois, pour guider avec précision le système optique du scanner sur les zones de reconnaissance il convient de contrôler de façon

suffisamment fine le déplacement relatif de la biopuce et/ou du système optique de lecture du scanner.

Ce contrôle ne pose pas trop de difficultés lorsque les zones de reconnaissance sont suffisamment grandes et peu nombreuses. Le déplacement relatif de la biopuce et du système optique peut être effectué efficacement avec des moyens mécaniques relativement peu coûteux.

Par contre, pour des puces de haute densité, dont les zones de reconnaissance présentent des dimensions qui n'excèdent pas quelques microns, des moyens mécaniques extrêmement précis sont indispensables pour garantir un balayage correct des zones de reconnaissance, et l'obtention d'une image nette et non déformée.

Des moyens mécaniques extrêmement précis sont également indispensables pour obtenir un balayage à vitesse régulière des zones de reconnaissance de petite taille afin de pouvoir corriger l'image obtenue, et exploiter l'image en fonction du déplacement.

A titre d'illustration, pour une puce de haute densité, comprenant par exemple 300x300 zones de reconnaissance adjacentes de 20 $\mu$ m de côté, et pour un échantillonnage de mesure typique de 7x7 points, il faut une résolution de déplacement de 3 $\mu$ m, une précision sur ce déplacement de 1 $\mu$ m ( $\pm 0,5\mu$ m) et une répétabilité de positionnement de 1 $\mu$ m ( $\pm 0,5\mu$ m). La vitesse de déplacement doit être constante et le parallélisme des déplacements pour le balayage doit être garanti à 0,3 mrad près. Une mécanique bas coût ne présente pas ces caractéristiques.

Par ailleurs, pour assurer la mise au point du système optique, avant la lecture de la puce, il faut

orienter la puce dans l'espace et la déplacer avec une résolution de  $10\mu\text{m}$ , une précision de  $5\mu\text{m}$  environ et une répétabilité de l'ordre de  $10\mu\text{m}$ . Ces caractéristiques sont indiquées pour une profondeur de section de  $100\mu\text{m}$  du système optique. La réduction de la profondeur de section à  $10\mu\text{m}$  impose alors, sur la mise au point, une résolution minimale de  $2,5\mu\text{m}$ , une précision de  $0,5\mu\text{m}$  et une répétabilité de  $1\mu\text{m}$ .

L'exigence de moyens mécaniques de précision rend les dispositifs de lecture de biopuces particulièrement onéreux.

De plus, comme la surface des zones de reconnaissance des biopuces de haute densité est faible, il est nécessaire de balayer les biopuces de façon lente pour collecter une quantité d'énergie lumineuse suffisante pour chaque échantillonnage de chaque zone de reconnaissance.

Or, un balayage lent rend l'analyse de la biopuce exagérément long dès lors que celle-ci comporte un nombre élevé de zones de reconnaissance.

La quantité de lumière produite par la fluorescence peut être légèrement augmentée en excitant les marqueurs des molécules cibles au moyen de lasers puissants. Cependant, l'utilisation de tels équipements augmente encore le coût des dispositifs de lecture.

#### Exposé de l'invention

Un but de la présente invention est de proposer un dispositif de lecture de biopuces ne présentant pas les difficultés mentionnées ci-dessus.

Un but est en particulier de proposer un tel dispositif qui soit d'un coût réduit et qui permette de lire des biopuces de haute densité.

Un but est aussi de proposer un tel dispositif permettant de balayer plus rapidement les puces, et de réduire ainsi le temps d'analyse, sans compromettre la qualité des mesures.

5 Un autre but est encore de proposer un dispositif capable de repérer rapidement la position et l'orientation d'une zone de reconnaissance sans effectuer une acquisition suréchantillonnée de l'image de la puce.

10 L'invention a également pour but de proposer une biopuce adaptée audit dispositif de lecture de façon à réduire au maximum le coût des mécanismes de balayage.

Pour atteindre ces buts, l'invention a plus 15 précisément pour objet un dispositif de lecture d'une biopuce comportant une pluralité de zones de reconnaissance moléculaire et une pluralité de repères optiques de position, associés aux zones de reconnaissance, le dispositif comportant :

20 - une tête optique apte à projeter sur la biopuce une lumière incidente susceptible d'exciter des molécules marquées présentes dans les zones de reconnaissance ou d'être réfléchie, diffractée ou diffusée, et susceptible d'éclairer des pistes de guidage et/ou 25 des repères de position,

- des moyens de déplacement relatif de ladite tête et ladite biopuce, aptes à effectuer un balayage de la biopuce,

- un premier système optique, dit système d'analyse, 30 associé à la tête optique pour projeter sur au moins un premier capteur électrooptique une lumière susceptible d'être émise ou réfléchie, ou diffusée ou encore diffractée par les zones de reconnaissance,

- un deuxième système optique, dit système de positionnement, associé à la tête optique pour projeter sur au moins un deuxième capteur électrooptique une lumière susceptible de provenir d'au moins une piste de guidage et/ou un repère de position, et
- des moyens d'asservissement des moyens de déplacement de la tête optique pour contrôler les moyens de déplacement en fonction de signaux électriques du capteur électrooptique du système optique de positionnement.

Dans la suite du texte, l'expression "lumière susceptible de provenir des molécules marquées..." sera employée par commodité pour désigner la lumière susceptible d'être émise en fluorescence, ou réfléchie, ou diffusée, ou réfractée par des groupements spécifiques équipant les molécules marquées présentes dans les zones de reconnaissance.

Des déplacements microscopiques sont utilisés pour affiner la position de la tête optique selon au moins un des trois axes. (Un premier axe correspondant à l'axe optique du premier système optique, et deux axes perpendiculaires au premier axe).

On entend par zone de reconnaissance une portion de la biopuce qui présente à sa surface des molécules présentant une propriété de reconnaissance d'un type donné de molécules cibles.

L'asservissement du balayage de la tête optique aux signaux électriques du système de positionnement permet de corriger en temps réel le déplacement relatif de la puce et de la tête optique, et d'obtenir un positionnement extrêmement précis avec des moyens mécaniques de déplacement peu coûteux. En particulier,

il devient possible d'utiliser des moyens mécaniques tels que les actionneurs qui équipent usuellement les lecteurs de disques compacts.

L'asservissement permet en outre d'obtenir un 5 déplacement relatif homogène en vitesse en vue d'une lecture en continu de la fluorescence des zones de reconnaissance.

De plus, la précision de la mise au point obtenue par l'asservissement permet d'utiliser un 10 système optique confocal avec une faible profondeur de section de façon à réduire l'influence d'une lumière parasite provenant du substrat de la biopuce. Ainsi une meilleure dynamique de signal peut être obtenue.

Les systèmes optiques du dispositif de lecture, 15 affranchis de la lumière parasite, grâce à une faible profondeur de section, peuvent être réalisés avec une ouverture numérique plus grande et collecter par conséquent davantage de lumière. Une lecture plus rapide est par conséquent possible et/ou la source de 20 lumière incidente peut être moins puissante.

Selon un aspect de l'invention, les moyens de déplacement relatif peuvent comporter des premiers moyens de déplacement macroscopique (à grande échelle) et des moyens de déplacement microscopique (à petite 25 échelle). Dans ce cas, les moyens d'asservissement sont connectés notamment aux moyens de déplacement microscopique.

Selon un autre aspect avantageux de l'invention, la tête optique peut comporter une 30 lentille de focalisation et au moins un actionneur de déplacement axial de mise au point de la lentille. Un troisième système optique, dit de mise au point, peut être associé à la tête optique pour projeter sur un

troisième capteur électrooptique une lumière provenant d'une réflexion de la lumière incidente sur la biopuce, et des moyens d'asservissement de mise au point, reliés à l'actionneur, peuvent être prévus pour contrôler le déplacement de mise au point de la lentille.

5 Grâce aux moyens d'asservissement de la mise au point, la lecture des zones de reconnaissance peut être effectuée de façon continue en même temps que la mise au point. Cette caractéristique permet en outre de ne 10 pas perdre le repérage sur la biopuce et permet d'augmenter la précision des mesures, indépendamment des conditions de balayage.

15 Selon une réalisation particulière simplifiée du dispositif, celui-ci peut comporter un système optique unique incluant les premier et deuxième systèmes optiques et au moins un capteur électrooptique commun aux premier et deuxième systèmes optiques, ledit capteur optique commun recevant non seulement la lumière provenant des zones de reconnaissance 20 moléculaire, mais encore la lumière provenant des repères de position. Le capteur commun est alors relié à un système de traitement du signal et aux moyens d'asservissement du balayage de la tête optique.

25 Dans cette réalisation, le capteur optique commun délivre par conséquent des signaux qui servent à la fois à l'analyse de la fluorescence et à l'asservissement du déplacement relatif de la puce et de la tête optique (balayage).

30 L'invention concerne également une biopuce pouvant être lue avec le dispositif décrit ci-dessus, et qui comporte une pluralité de zones de reconnaissance moléculaire et des repères optiques, distinctes des zones de reconnaissance.

Les pistes de guidage et/ou les repères optiques, associés aux zones de reconnaissance, comportent par exemple des plages réfléchissant la lumière d'excitation. Ils permettent d'orienter la 5 biopuce et d'effectuer un balayage précis, indépendamment du fait qu'une hybridation ait eu lieu ou non.

Selon une possibilité particulière de réalisation de la puce, un repère optique peut être 10 respectivement associé à chaque zone de reconnaissance. Il n'est ainsi pas nécessaire de former une image de l'ensemble de la biopuce pour connaître l'emplacement de chaque zone.

Ainsi, la possibilité de déterminer précisément 15 l'emplacement des zones de reconnaissance permet d'effectuer des mesures précises, sans sur-échantillonnage, et avec un nombre de pixels réduit pour chaque zone de reconnaissance.

En outre, dès lors que chaque zone de 20 reconnaissance est repérée, il est possible d'effectuer une analyse locale pour une ou plusieurs zones données en déplaçant la tête optique ou la puce, de façon à diriger directement la tête en face de la ou des zones souhaitées.

25 Plusieurs possibilités sont offertes pour enregistrer la lumière provenant des zones de reconnaissance de la puce.

Selon une première possibilité on peut immobiliser la tête optique en face d'une zone de 30 reconnaissance et effectuer une acquisition du signal pendant un temps déterminé, puis passer à une zone suivante.

Comme indiqué précédemment, les repères optiques et les moyens d'asservissement permettent de positionner la tête avec suffisamment de précision pour qu'une analyse fiable puisse être effectuée. De plus, 5 les repères optiques permettent de localiser précisément une zone de reconnaissance même dans un cas où celle-ci n'émet aucune lumière de fluorescence.

Les signaux de capteurs peuvent aussi être acquis "à la volée", en déplaçant continûment la tête 10 optique le long d'une pluralité de zones de reconnaissance juxtaposées. Dans ce cas on intègre les signaux pour déterminer la quantité de lumière reçue pendant le temps mis pour balayer une ou plusieurs zones de reconnaissance.

15 Des fluctuations de la vitesse de déplacement sont cependant susceptibles d'affecter l'analyse de la quantité de lumière émise par unité de temps par les zones de reconnaissance.

Ainsi, selon une deuxième possibilité 20 d'analyse, on peut normaliser les signaux acquis en fonction d'un temps s'écoulant entre le passage de la tête optique en face de repères de position successifs associés aux zones de reconnaissance parcourues.

Selon une troisième possibilité correspondant 25 également à une acquisition "à la volée", on peut asservir continûment la vitesse de déplacement relatif de la tête optique et de la puce en chronométrant le temps écoulé entre le passage de la tête en face des repères successifs.

30 D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention ressortiront mieux de la description qui va suivre, en référence aux figures des dessins

annexés. Cette description est donnée à titre purement illustratif et non limitatif.

Brève description des figures

5 - La figure 1 est une représentation schématique simplifiée d'un dispositif de lecture conforme à l'invention.

La figure 2 est une représentation schématique particulière d'un détail de la figure 1.

10 - La figure 3 est une vue de dessus, schématique et simplifiée, d'une biopuce conforme à l'invention apte à être lue par le dispositif de la figure 1.

15 - La figure 4 est une vue de dessus, schématique et simplifiée, d'une biopuce conforme à l'invention, et illustre un exemple de séquence de lecture d'une telle puce.

Description détaillée de modes de mise en oeuvre de l'invention

20 La référence 10 sur la figure 1 désigne une biopuce comportant une pluralité de zones de reconnaissance équipées de molécules de reconnaissance spécifiques, et éventuellement des pistes de guidage et/ou des repères optiques associés aux zones de reconnaissance. Ces éléments sont décrits plus en détail dans la suite du texte et ne sont pas représentés sur la figure 1 pour des raisons de simplification.

30 Dans l'exemple décrit, les molécules de reconnaissance spécifique sont marquées par des groupements fluorescents, mais ceux-ci peuvent être remplacés par des groupements pouvant réfléchir,

diffuser ou diffracter la lumière, sans sortir du cadre de l'invention.

La puce est disposée en face d'un dispositif de lecture 12. Ce dispositif est destiné à balayer les 5 zones de reconnaissance pour exciter des molécules, portant des marqueurs fluorescents, fixées sur les zones de reconnaissance, et pour enregistrer une lumière de fluorescence produite par ces molécules.

Le balayage des zones de reconnaissance est 10 effectué par un déplacement relatif entre le dispositif de lecture 12, ou une partie de celui-ci, et la biopuce 10.

Dans l'exemple de la figure 1 le déplacement macroscopique relatif est obtenu au moyen d'actionneurs 15 14, par exemple, des actionneurs à moteurs qui déplacent la biopuce 10. Un déplacement microscopique de la lentille 22 est obtenu au moyen d'un actionneur électromagnétique 24. La biopuce, de format 20 rectangulaire, est déplacée dans un plan perpendiculaire à un axe optique  $\Omega$  du dispositif de lecture.

Ce plan est également perpendiculaire au plan de la figure.

Le déplacement peut avoir lieu selon deux 25 directions x et y perpendiculaires indiquées sur la figure.

Le dispositif de lecture 12 comporte une tête optique 20 avec une lentille de focalisation 22 présentant un axe optique  $\Omega$ . La lentille de la tête 30 optique a une double fonction de diriger vers la biopuce une lumière d'excitation et de recueillir une lumière de fluorescence émise en réponse à la lumière d'excitation.

La lumière d'excitation est une lumière monochromatique, présentant une première longueur d'onde, par exemple de l'ordre de 633 nm. Elle est fournie par un laser 30 dont le faisceau est dirigé 5 vers la tête optique 20 par l'intermédiaire d'un miroir dichroïque 32. La lentille de focalisation 22 est prévue pour focaliser le faisceau sur une face arrière 18, dite face active, de la biopuce.

Le miroir dichroïque 32 réfléchit une partie 10 majoritaire (80 à 95%) de la lumière du laser vers la lentille de focalisation. La partie restante de la lumière (5 à 20%) traverse le miroir 32 pour être recueillie par un capteur électrooptique 33 appelé capteur de référence.

15 Le capteur de référence 33 permet de mesurer les fluctuations temporelles de l'intensité du faisceau émis par le laser 30. Cette mesure est prise en compte pour l'analyse de la fluorescence émise par la biopuce afin d'affranchir l'analyse des variations d'intensité 20 dues au laser.

Un premier système optique d'analyse 40 est associé à la tête optique, et aligné sur l'axe optique  $\Omega$  pour projeter une lumière de fluorescence produite par des molécules marquées excitées, éventuellement 25 présentes sur la biopuce, sur un (ou plusieurs) capteur(s) électrooptique(s) 42, appelé(s) capteur(s) d'analyse dans la suite du texte.

De façon plus précise, la lumière de fluorescence est recueillie et collimatée par la 30 lentille de focalisation 22 de la tête optique 20, pour former un faisceau. Ce faisceau traverse le miroir dichroïque 32 puis traverse une lentille de convergence 44 qui le fait converger sur un diaphragme 46. Le

diaphragme peut être formé en pratiquant un petit trou dans un écran opaque. Il permet d'effectuer un filtrage spatial selon l'axe optique  $\Omega$  et confère au système optique un caractère confocal.

5 En effet, le diaphragme, conjugué avec l'objet ponctuellement éclairé, ne laisse passer que de la lumière issue de la zone éclairée (par la lumière d'excitation) dans une fine "tranche" assimilable à un plan objet. L'attrait d'un système confocal est évident  
10 notamment pour la lecture de puces à ADN. La possibilité de définir une "tranche" de l'espace objet, est mise à profit pour isoler un plan d'intérêt contenant les zones de reconnaissance moléculaire, du reste de la puce (support en verre, tampons). La  
15 lumière reçue est donc libre d'une lumière parasite provenant d'éventuels centres colorés du support, et libre d'un fond continu lumineux.

Le phénomène de fluorescence des marqueurs fluorescents, portés par les molécules cibles retenues  
20 sur les zones de reconnaissance, se traduit par une conversion de la lumière d'excitation en une lumière présentant une longueur d'onde supérieure à celle de la lumière d'excitation.

La longueur d'onde de la lumière de  
25 fluorescence est par exemple de 670 nm dans l'exemple décrit.

Un filtre interférentiel 48 est disposé entre la lentille de focalisation 22 de la tête optique et la lentille de convergence 44. Il permet d'isoler dans la  
30 lumière reçue par le système optique d'analyse une bande spectrale correspondant sensiblement à la bande spectrale de fluorescence. Les lumières parasites sont ainsi davantage éliminées.

La référence 50 désigne une unité de traitement des signaux délivrés par le capteur d'analyse 42. Dans l'exemple décrit, le capteur d'analyse 42 est un capteur à photomultiplicateur qui délivre un signal analogique proportionnel à l'intensité de la lumière de fluorescence reçue.

Le signal du capteur d'analyse peut être intégré pendant une durée de temps lors de laquelle la tête optique reçoit la lumière d'une zone de reconnaissance donnée. Comme évoqué précédemment, le signal peut également être enregistré dans un procédé de mesure "à la volée" lors d'un balayage de la puce. Le signal peut aussi être numérisé de façon à pouvoir le traiter selon des algorithmes adaptés au type 15 d'analyse effectué.

On observe que l'unité de traitement 50 reçoit également un signal de référence provenant du capteur de référence 33. La prise en compte du signal de référence permet de normaliser les signaux délivrés par 20 le capteur d'analyse qui sont, comme évoqué ci-dessus, affranchis des fluctuations de l'intensité du laser.

Le miroir dichroïque 32, associé à un cube séparateur 34 permet de diriger vers un deuxième système optique 60 de la lumière provenant d'une 25 réflexion, ou diffraction, ou réfraction ou une diffusion de la lumière incidente du laser sur la biopuce. Cette lumière réfléchie provient, par exemple, des pistes de guidage et/ou de repères de positions ménagées sur la biopuce. Dans le cas où la biopuce ne 30 comporte pas de pistes de guidage, la biopuce peut être déposée sur une platine comportant des pistes de guidage.

Le deuxième système optique 60, appelé système de positionnement, comporte une lentille 64 permettant de focaliser la lumière reçue sur au moins un capteur électrooptique 62, tel que par exemple des détecteurs à quatre quadrants, ou multiquadrants, associés à un système optique astigmatique d'analyse du faisceau. Le capteur électrooptique 62 peut aussi comporter une barrette CCD, ou une photorésistance différentielle ou tout système de mesure de position.

Le capteur électrooptique du système de positionnement est relié à une unité 70, appelée unité d'asservissement. L'unité d'asservissement permet, par exemple, de décoder les signaux du capteur pour détecter le passage de la tête optique en face d'un repère de position, de compter les repères de position rencontrés, et de piloter le déplacement du balayage pour suivre une série de repères correspondant à une série de zones de reconnaissance. A cet effet, l'unité d'asservissement 70 est connectée aux actionneurs 14 et/ou 24 pour contrôler les mouvements de la biopuce et/ou de la lentille 22. Elle permet aussi de maintenir dynamiquement la tête optique le long d'une trajectoire de balayage imposée par des repères disposés sur la biopuce.

A titre d'exemple, les actionneurs peuvent être contrôlés de telle façon que l'intensité de la lumière reçue par le capteur du système optique de positionnement soit comprise dans une plage de valeurs déterminées. Le point de fonctionnement correspond à un état d'équilibre. On donne une consigne de position et le système d'asservissement maintient cette consigne. On cherchera par exemple, à ce que la répartition de

l'intensité de lumière sur le détecteur multiquadrants soit toujours la même.

Un deuxième cube séparateur 36, disposé dans le deuxième système optique, permet de diriger une partie 5 de la lumière de ce système optique dans un troisième système optique 80, appelé, système de mise au point.

Le système optique de mise au point 80 comprend une lentille 84 pour focaliser la lumière reçue sur un capteur électrooptique 82 tel que par exemple : 10 détecteurs 4 quadrants ou multiquadrants associés à un système optique astigmatique d'analyse du faisceau, ou barrette CCD, ou photorésistance différentielle ou tout système de mesure de position.

La lumière dirigée sur le capteur du système 15 optique de mise au point provient d'une réflexion de la lumière du laser sur la biopuce. Elle peut provenir en particulier des repères de positionnement ou d'une réflexion vitreuse sur la face active de la biopuce.

Le capteur 82 du système optique 80 de mise au 20 point est également relié à l'unité d'asservissement 70. Cette unité est conçue pour piloter un actionneur 24 solidaire de la lentille 22 de la tête optique 20. L'actionneur 24 permet de déplacer la lentille 22 selon 25 son axe  $\Omega$  de façon à corriger continûment la mise au point des systèmes optiques sur la biopuce, ou plus précisément sur certaines parties de la biopuce.

A titre d'exemple, l'unité d'asservissement peut être prévue pour provoquer un déplacement de la lentille 22 de la tête optique de telle façon que la 30 surface d'une tache de focalisation sur le capteur du système de mise au point soit contrôlée par rapport à la surface (forme et/ou position) d'une tâche de référence (par exemple circulaire).

Selon un mode de réalisation simplifié le capteur électrooptique du premier système optique 40, c'est-à-dire le système optique d'analyse, peut être utilisé à la fois pour délivrer des signaux électriques correspondant à la lumière provenant des zones de reconnaissance et des signaux correspondant à de la lumière réfléchie ou diffusée par les pistes de guidage et/ou les repères de position.

Dans ce cas, le capteur est relié non seulement à l'unité 50 de traitement des signaux mais aussi, comme le montre la figure en trait discontinu, à l'unité d'asservissement, pour piloter le déplacement relatif de la puce et de la tête optique, et éventuellement pour la mise au point de la lentille de la tête optique.

Dans ce mode de réalisation, le dispositif de lecture comporte un système optique unique qui inclut de façon fonctionnelle les premier, deuxième (et éventuellement troisième) systèmes optiques décrits précédemment.

La figure 2 montre une réalisation particulière du système optique d'analyse.

Pour des raisons de simplification, la figure 2 ne représente qu'un détail du dispositif, les autres éléments étant identiques à ceux décrits en référence à la figure 1.

Le système optique d'analyse 40 de la figure 2 comporte un filtre interférentiel 48, et un objectif de focalisation 44a prévu pour focaliser un faisceau de lumière de fluorescence reçu de la tête optique 20 sur une première extrémité d'une fibre optique 47.

Une deuxième extrémité de la fibre optique 47 est reliée un capteur électrooptique tel qu'un

photomultiplicateur ou une photodiode à avalanche. La fibre optique 47 (faiblement multimode) joue le rôle du diaphragme confocal 46 visible sur la figure 1.

Les systèmes optiques d'analyse des figures 1  
5 et 2 sont, comme indiqué ci-dessus, des systèmes  
confocaux.

Les principales qualités d'un système confocal  
sont sa grande résolution spatiale et sa grande  
résolution axiale. La résolution axiale traduit la  
10 capacité du système à isoler un très petit volume  
d'observation autour du plan de focalisation, c'est-à-  
dire la capacité à éliminer les lumières parasites de  
l'extérieur de ce volume. Elle est caractérisée par une  
"profondeur de section" du système notée Pds.

15 La profondeur de section Pds, déjà évoquée  
précédemment, peut être exprimée selon la formule  
suivante :

$$Pds = \frac{0,443 \cdot \lambda}{1 - \cos(u)}$$

où  $\lambda$  est la longueur d'onde exprimée en micromètres et  
20  $u$  le demi-angle du cône d'ouverture numérique du  
système optique.

Les lentilles mises en oeuvre pour réaliser le  
système optique d'analyse présentent des ouvertures  
numériques de l'ordre de 0,4 à 0,5. Ainsi, des  
25 profondeurs de section de l'ordre de 1,8 à 2,8  $\mu\text{m}$   
peuvent être obtenues. De plus, 16 à 22% du flux  
lumineux émis par la biopuce sont collectés par la  
lentille.

Il convient à présent de décrire plus en détail  
30 un exemple de réalisation d'une biopuce adaptée au  
dispositif de lecture.

La figure 3 montre une telle biopuce. La biopuce 10 comprend un substrat 100 sur lequel sont ménagées des zones de reconnaissance 110. Les zones 110 coïncident par exemple avec des électrodes formées à la 5 surface du substrat. Ces électrodes ont été sélectivement garnies avec un revêtement susceptible d'interagir avec un composé chimique ou biologique donné. Comme évoqué dans la partie introductory du texte, la garniture peut en particulier comporter des 10 molécules de reconnaissance susceptibles de s'hybrider avec des molécules cibles.

Les différentes zones de reconnaissance 110 sont garnies de molécules de reconnaissance différentes, spécifiques respectivement pour des 15 molécules cibles données.

On observe que les zones de reconnaissance 110, de forme rectangulaire, sont agencées en lignes et en colonnes. D'autres motifs de répartition à la surface du substrat, par exemple en cercle, sont cependant 20 envisageables.

La biopuce 10 comporte également un réseau 120 de repères de position optiques, associé aux zones de reconnaissance. Dans l'exemple illustré, ce réseau comporte des pistes de guidage 122 sous la forme de 25 bandes rectilignes s'étendant respectivement entre des lignes successives de zones de reconnaissance.

Les pistes de guidage sont des pistes réfléchissantes ou partiellement réfléchissantes, fluorescentes ou diffusantes, capables de renvoyer vers 30 le dispositif une partie de la lumière d'excitation. Elles peuvent être également déphasantes, c'est-à-dire qu'elles créent une différence de marche lors de la propagation de l'onde retour. La lumière d'excitation

renvoyée vers le dispositif est analysée par le deuxième et éventuellement le troisième systèmes optiques pour localiser et repérer les lignes de zones de reconnaissance et pour assurer le balayage de la 5 biopuce. Les pistes réfléchissantes peuvent également comporter une surface structurée avec des gravures déphasantes susceptibles de former des figures d'interférence, ou d'introduire un déphasage dans la lumière d'excitation. Ces figures d'interférence ou de 10 déphasage, reçues par le système optique de positionnement du dispositif de lecture peuvent également servir au repérage ou à l'asservissement du balayage.

Les repères de position comportent également 15 des plages optiques 124 appelées codeurs.

Les codeurs 124 sont de préférence situés sur les pistes de guidage 122 au début et à la fin de chaque zone de reconnaissance selon un pas correspondant à la taille desdites zones.

20 Les codeurs sont par exemple des plages correspondant à une interruption du matériau réfléchissant ou une interruption de la surface structurée des pistes de guidage 122.

Selon une variante, la puce peut également être 25 équipée des seules pistes de guidage qui sont alors des plages réfléchissantes, par exemple.

L'association de codeurs ou plus généralement de repères optiques à chaque zone de reconnaissance permet une localisation particulièrement rapide et 30 précise des zones.

Toutefois, il est également possible d'associer un seul repère à un ensemble de zones de

reconnaissance ; par exemple, un repère pour chaque ligne ou colonne de zones de reconnaissance.

La fabrication des repères fait appel à des techniques classiques de la micro-électronique. Elle 5 comporte par exemple le dépôt en pleine plaque d'une couche métallique réfléchissante tel qu'une couche d'aluminium, de nickel ou de chrome, et la mise en forme par photolithogravure de cette couche selon un motif correspondant aux emplacements souhaités des 10 repères de position.

A titre d'exemple, la couche métallique peut être gravée selon un procédé de gravure chimique en phase liquide ou un procédé de gravure à plasma en phase gazeuse, et selon un motif de gravure déterminée 15 par un masque de gravure en résine.

Après la gravure et l'élimination de la résine, une fine couche de silice peut être formée sur le support afin d'améliorer la compatibilité de la surface avec le greffage de molécules biologiques.

20 Il convient de préciser que les zones de reconnaissance ne sont pas nécessairement adjacentes et que les repères optiques ne sont pas nécessairement positionnés à la périphérie des zones de reconnaissance.

25 Selon une possibilité d'agencement, non représentée, des repères optiques réfléchissants peuvent être ménagés à l'intérieur des zones de reconnaissance.

Une telle configuration n'est pas gênante quand 30 la lumière provenant des zones de reconnaissance est une lumière de fluorescence. En effet, dans la mesure où la distinction entre la lumière de fluorescence et la lumière réfléchie par les zones de reconnaissance

est faite sur la base de la différence de longueur d'onde entre ces lumières.

Dans le cas d'une détection de molécules non fluorescentes, mais par exemple diffusantes ou 5 diffractantes, la distinction peut être faite par un codage des signaux en fréquence ou en réalisant la mesure à un angle différent de celui utilisé pour les asservissements de position.

Après l'achèvement des repères optiques, les 10 zones de reconnaissance peuvent être garnies des molécules de reconnaissance. La synthèse de ces molécules et leur fixation sur les zones de reconnaissance ont lieu selon des techniques de synthèse par photolithographie connues en soi.

15 On peut remarquer que la surface de la biopuce n'est pas parfaitement plane. Elle présente une sur-épaisseur de l'ordre de 50 nm à 200 nm à l'endroit des plages réfléchissantes des repères optiques.

De telles différences d'épaisseur restent 20 faibles comparativement à la profondeur de section du système optique d'analyse proposé.

La réalisation des repères optiques et la synthèse des molécules de reconnaissance sont des opérations qui peuvent avoir lieu collectivement pour 25 une pluralité de biopuces, sur une plaquette de silicium ou de verre (wafer). Cette plaquette est ensuite découpée pour individualiser les biopuces fabriquées simultanément.

La figure 4 représente également une biopuce 10 30 avec des pistes de guidage 122 et des repères de position optiques sous la forme de codeurs 124a en un matériau réfléchissant (Cr par exemple) ménagés le long des pistes 122.

Sur la surface de la puce on peut distinguer une pluralité de zones de reconnaissance ou cellules 110, de forme carrée, repérées par des lignes en trait discontinu. Chaque zone de reconnaissance est traversée 5 par quatre pistes de guidage.

De façon schématique on indique sur la figure 4, en trait mixte, les positions successives d'un spot de lumière d'excitation. Les positions sont repérées par des lettres alphabétiques A à G.

10 Les moyens de déplacement de la puce (actionneur) sont tels que le mouvement du spot de lumière peut être décomposé selon un mouvement selon un premier axe x, appelé axe rapide, et selon un deuxième axe y, appelé axe lent.

15 Un exemple de procédure de lecture d'une biopuce est indiqué dans le tableau I qui doit être lu en conjonction avec les lettres d'indication de position du spot sur la figure 4.

Le tableau I indique, en particulier pour 20 chaque position, le mouvement effectué et précise l'activation des fonctions de mise au point, de positionnement et de lecture (analyse).

TABLEAU I

Opéra- tions	Description	Fonctions		
		Asservissement mise au point	Asservissement Positionnement	Mesure
A	Translation suivant l'axe lent Spot sur un coin de la puce Recherche de la mise au point	NON→OUI	NON	NON
B	Translation suivant l'axe lent Recherche du début de la piste n°1	OUI	NON→OUI	NON
C	Translation suivant l'axe lent Repérage du début de la cellule n° 1⇒début de la mesure	OUI	OUI	NON→OUI
D	Translation suivant l'axe rapide Repérage de la fin de la cellule n° 1⇒fin de la mesure	OUI	OUI	OUI→NON
E	translation suivant l'axe rapide Mesure de la fluorescence dans la cellule n° 2	OUI	OUI	OUI
F	Translation suivant l'axe lent Recherche de la piste 2	OUI	NON→OUI	NON
G	positionnement sur une piste donnée Translation suivant l'axe lent Comptage du nombre de pistes qui défilent	OUI	NON→OUI	NON

27.04.00

Les indications "piste 1", "piste 2" indiquent dans l'ordre les pistes 111 dans la direction y à partir du bas de la figure et les indications "cellule n°1", "cellule n°2" indiquent les zones de reconnaissance successives dans la direction x à partir de la partie gauche de la figure.

5 Les références 152, 154 sur les figures représentent à titre indicatif un signal susceptible d'être émis par le capteur du système de positionnement 10 lors d'un balayage de spot au-dessus des codeurs 124a, respectivement selon les directions x et y.

DOCUMENTS CITES

(1)

15 US-A-5 646 411

(2)

"La puce ADN : un multiréacteur de paillasse" de M. Bellis et P. Casellas, dans Médecine/Sciences, n°11, vol. 13, 1997, pages 1317 à 1324

20 (3)

"DNA sequencing by hybridization - a megasequencing method and diagnostic tool ?" de A.D. Mirzabekov dans TIBTECH, volume 12, Janvier 1994, pages 27-32, Elsevier Science.

25 (4)

"DNA chips : An array possibilities" de A. Marshall et J. Hodgson dans Nature Biotechnology, volume 16, janvier 1998, p. 27-31.

(5)

30 WO-A-98 01533

(6)

US-A-5 721 435

## REVENDICATIONS

1. Dispositif de lecture d'une biopuce comportant une pluralité de zones de reconnaissance moléculaire (110), caractérisé en ce qu'il comporte en 5 outre :

- une tête optique (20) apte à projeter sur la biopuce une lumière incidente,
- des moyens de déplacement (14) et/ou (24) de ladite tête et/ou de ladite biopuce, aptes à effectuer un 10 balayage de la biopuce,
- un premier système optique (20), dit système d'analyse associé à une tête optique pour projeter sur au moins un premier capteur électrooptique (42) une lumière provenant de la biopuce et mettant en 15 évidence la présence ou l'absence de molécules cibles sur chaque zone de reconnaissance moléculaire,
- un deuxième système optique (60) dit système de positionnement associé à une tête optique pour projeter sur un deuxième capteur électrooptique (62) une deuxième lumière provenant d'au moins une piste 20 de guidage,
- des moyens d'asservissement du balayage de ladite tête optique pour contrôler les moyens de déplacement (14 et/ou (24) en fonction de signaux électriques du 25 capteur électrooptique du système optique de positionnement (62).

2. Dispositif de lecture d'une biopuce (10), comportant une pluralité de zones de reconnaissance moléculaire (110) et une pluralité de repères optiques 30 de position (122, 124, 124a), associés aux zones de reconnaissance, le dispositif comportant :

- une tête optique (20) apte à projeter sur la biopuce une lumière d'excitation susceptible d'exciter des

molécules marquées présentes dans les zones de reconnaissance (110), et susceptible d'éclairer les repères optiques,

- des moyens (14) et/ou (24) de déplacement relatif de ladite tête et ladite biopuce, aptes à effectuer un balayage de la biopuce,
- un premier système optique (40), dit système d'analyse, associé à la tête optique pour projeter sur au moins un premier capteur électrooptique (42) une lumière susceptible de provenir des zones de reconnaissance,
- un deuxième système optique (60), dit système de positionnement, associé à la tête optique pour projeter sur au moins un deuxième capteur électrooptique (62) une lumière susceptible de provenir d'au moins un repère de position, et
- des moyens (70) d'asservissement des moyens de déplacement de la tête optique pour contrôler les moyens de déplacement (14) et/ou (24) en fonction de signaux électriques du capteur électrooptique du système optique de positionnement (62).

3. Dispositif de lecture d'une biopuce selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que la lumière émise par les molécules cibles présentes sur les zones de reconnaissance est une lumière de fluorescence.

4. Dispositif selon la revendication 1 ou 2, dans lequel les moyens de déplacement relatif comportent des premiers moyens de déplacement macroscopique (14) (à grande échelle) et des moyens de déplacement microscopique (24) (à petite échelle) et dans lequel les moyens d'asservissement sont connectés aux moyens de déplacement microscopique.

5. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel le système optique d'analyse (40) est un système optique confocal.

5 6. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel le premier capteur électrooptique (42) est un photomultiplicateur.

10 7. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel le premier capteur électrooptique (42) est optiquement relié au premier système optique par l'intermédiaire d'une fibre optique (47).

15 8. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, comprenant un laser (30) pour fournir la lumière d'excitation, et un capteur de référence (33), recevant une partie de la lumière du laser, pour corriger un signal du premier capteur électrooptique en fonction de fluctuations temporelles du laser.

20 9. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans lequel les premier et deuxième systèmes optiques sont couplés à la tête optique par l'intermédiaire d'une lame dichroïque (32).

25 10. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, dans lequel la tête optique (20) comporte une lentille (22) de focalisation et au moins un actionneur (24) de déplacement axial et/ou latéral de mise au point de la lentille (22), et comportant un troisième système optique (80), dit de mise au point, associé à la tête optique (20), pour projeter sur un 30 troisième capteur électrooptique une lumière provenant de la réflexion de la lumière incidente sur la biopuce, et des moyens (70) d'asservissement de mise au point

reliés à l'actionneur (24) pour contrôler le déplacement de mise au point de la lentille.

11. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, comprenant un système optique unique, incluant les premier et deuxième systèmes optiques et au moins un capteur électrooptique commun aux premier et deuxième systèmes optiques, ledit capteur optique commun recevant la lumière provenant des zones de reconnaissance moléculaire et la lumière provenant d'au moins une piste de guidage et/ou de repères de position, et étant relié aux moyens d'asservissement du balayage de la tête optique.

12. Biopuce (10) apte à être lue par un dispositif de lecture, comportant une pluralité de zones de reconnaissance moléculaire, caractérisée en ce qu'elle est munie d'au moins une piste de guidage (122) du dispositif de lecture sur tout ou partie de la surface de ladite biopuce.

13. Biopuce selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'elle est munie en outre de repères optiques de positionnement sur la périphérie de la biopuce et/ou le long de la ou des piste(s) de guidage.

14. Biopuce selon la revendication 13, caractérisée en ce que les repères de positionnement sont disposés sur la ou les piste(s) de guidage.

15. Biopuce selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisée en ce que les positions des zones de reconnaissance moléculaire par rapport à la ou les piste(s) de guidage sont prédéterminées.

16. Biopuce selon la revendication 15, caractérisée en ce que les zones de reconnaissance

chevauchent tout ou partie de la ou des piste(s) de guidage.

17. Biopuce selon l'une quelconque des revendications 12 à 16, dans laquelle un repère optique 5 (124, 124a) est respectivement associé à chaque zone de reconnaissance moléculaire.

18. Biopuce selon l'une quelconque des revendications 12 à 17, dans laquelle les zones de reconnaissance moléculaire (110) sont agencées en 10 lignes et en colonnes, et dans laquelle au moins un repère optique (124) est associé à chaque ligne et/ou à chaque colonne de zones de connaissance.

19. Biopuce selon l'une quelconque des revendications 12 à 18, dans laquelle les repères 15 optiques comportent des plages aptes à réfléchir une lumière incidente.

20. Biopuce selon l'une quelconque des revendications 12 à 19, dans laquelle les repères optiques comportent des plages avec une surface 20 structurée apte à introduire un déphasage dans une lumière incidente.

21. Biopuce selon l'une quelconque des revendications 12 à 18, dans laquelle les repères optiques comportent des pistes de positionnement en un 25 matériau diffusant ou fluorescent, s'étendant le long de rangées de zones de reconnaissance, et des plages réfléchissantes disposées sur lesdites pistes de positionnement.

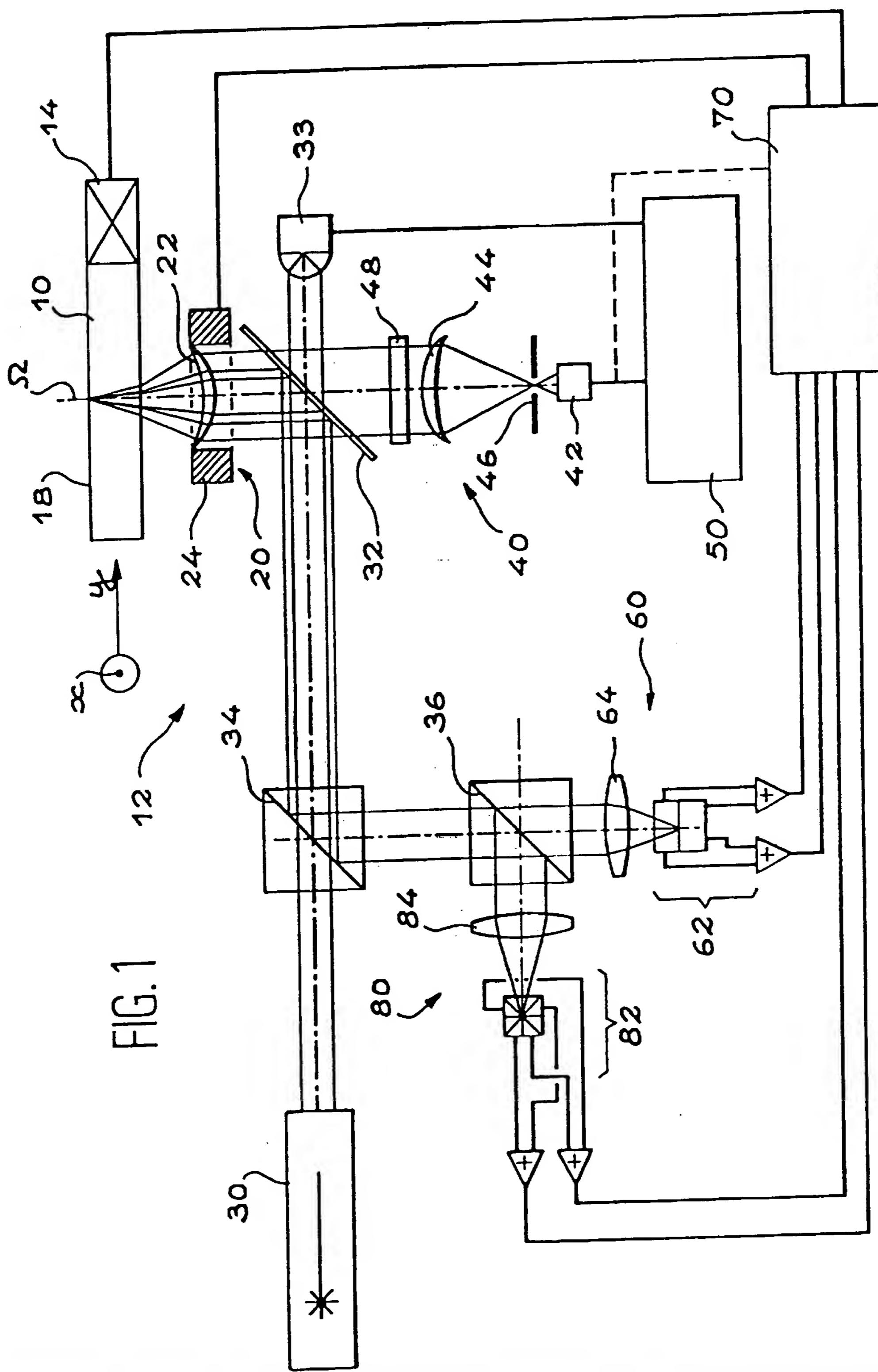
22. Biopuce selon l'une quelconque des 30 revendications 12 à 18, dans laquelle les repères optiques comportant des pistes réfléchissantes (122) s'étendent le long de rangées de zones de

reconnaissance (110), les pistes présentant localement des plages (124) non réfléchissantes.

23. Procédé de lecture au moyen d'un dispositif conforme à l'une des revendications 1 à 11, d'une 5 biopuce selon l'une des revendications 12 à 22.

24. Procédé de lecture, au moyen d'un dispositif conforme à l'une quelconque des revendications 1 à 12, d'une biopuce comportant une pluralité de zones de reconnaissance moléculaire et une 10 pluralité de repères optiques de position associés aux zones de reconnaissance, selon lequel on acquiert continûment des signaux de lecture provenant d'un capteur du système optique d'analyse, en balayant une succession de zones de mesure, et selon lequel on 15 normalise lesdits signaux acquis en fonction d'un temps s'écoulant entre le passage de la tête optique en face de repères de position successifs associés auxdites zones de reconnaissance balayées.

25. Procédé de lecture, au moyen d'un dispositif conforme aux revendications 23 ou 24, d'une 20 biopuce comportant une pluralité de zones de reconnaissance moléculaire et une pluralité de repères optiques de position associés aux zones de reconnaissance, selon lequel on acquiert continûment 25 des signaux de lecture provenant d'un capteur du système d'analyse, en balayant une succession de zones de reconnaissance, et selon lequel on asservit continûment une vitesse de déplacement relative entre la tête optique et la biopuce en fonction d'un temps 30 mesuré entre des passages successifs de la tête optique en face de repères de position successifs associés aux zones de reconnaissance balayées.



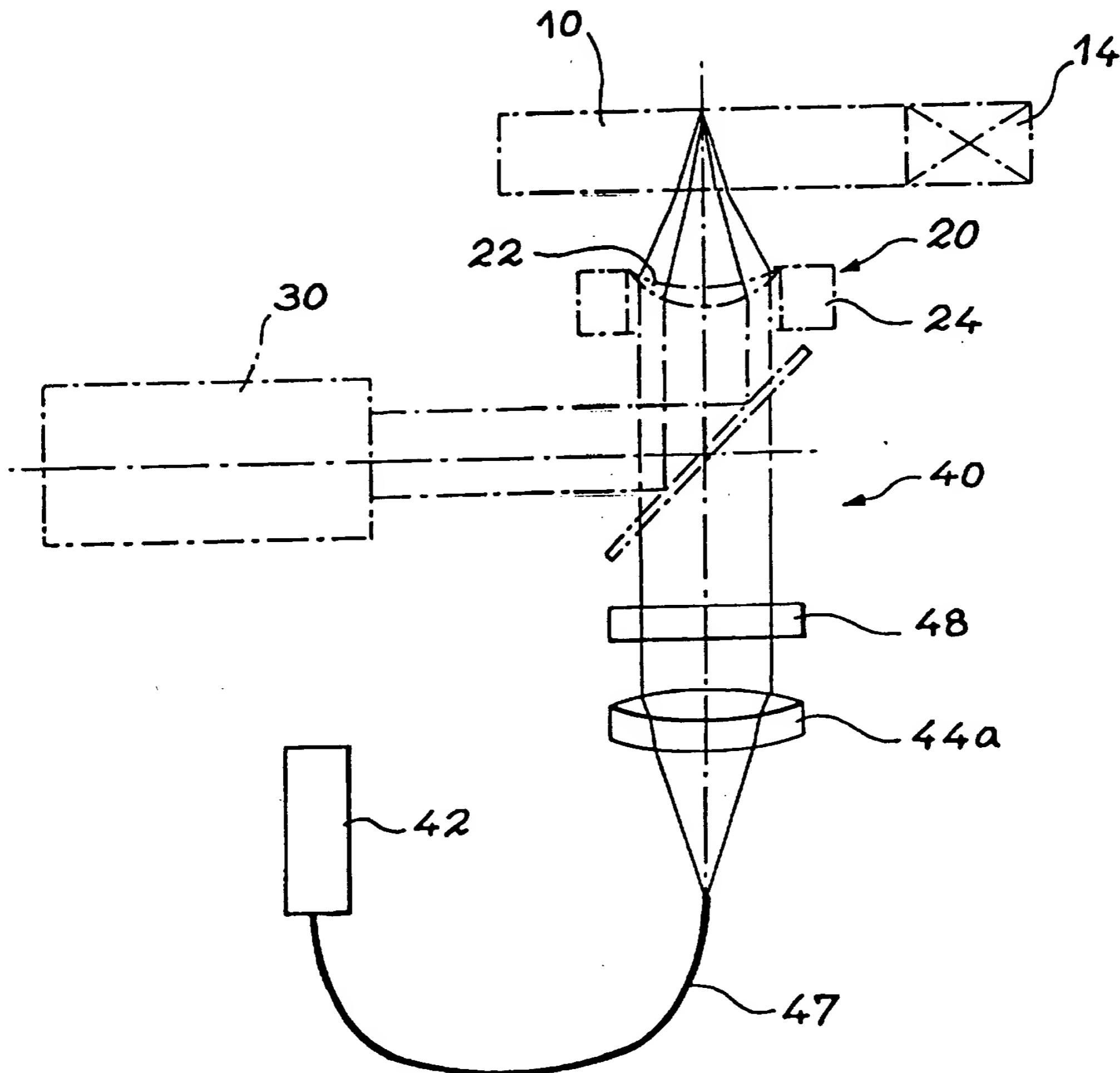


FIG. 2

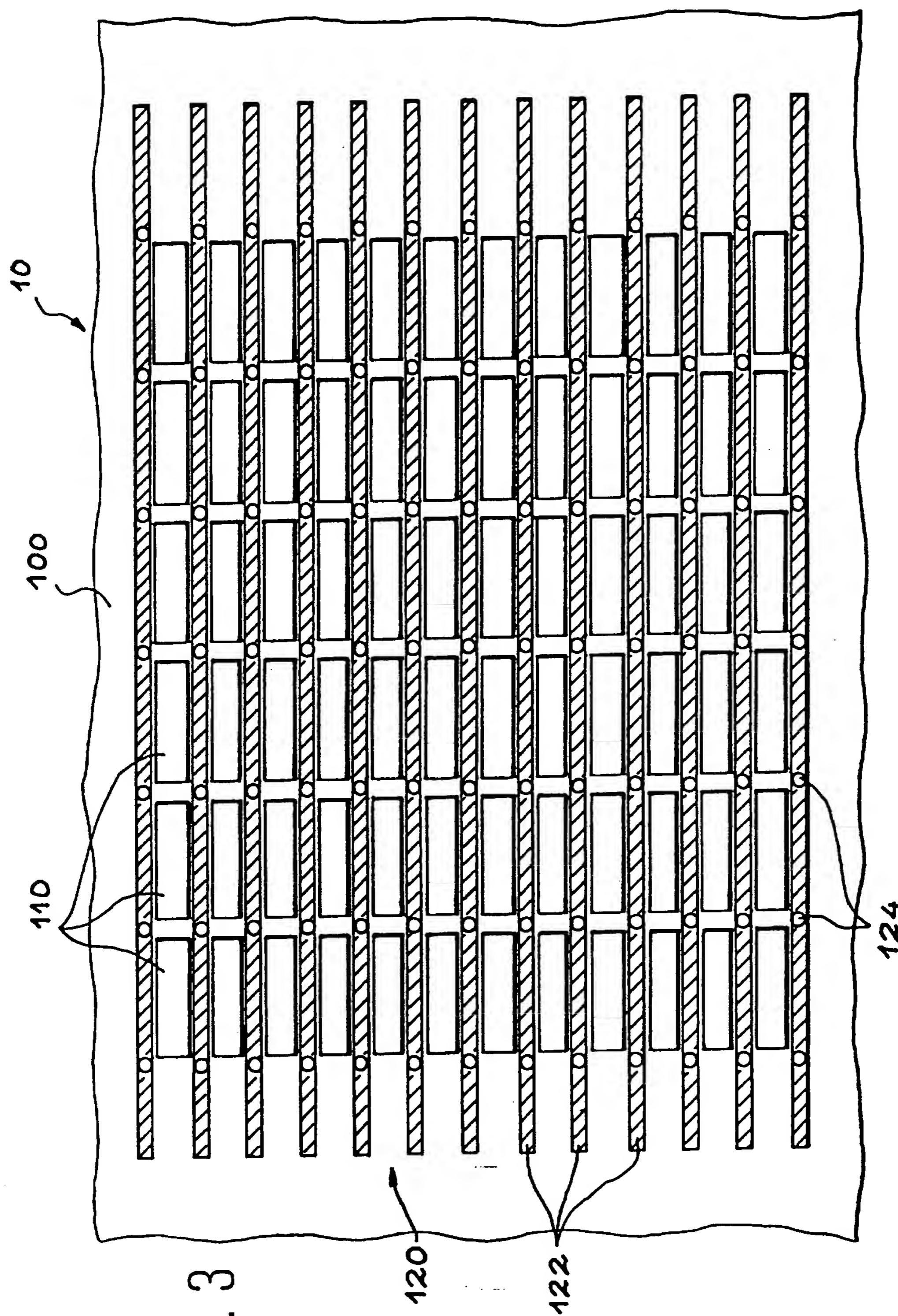


FIG. 3

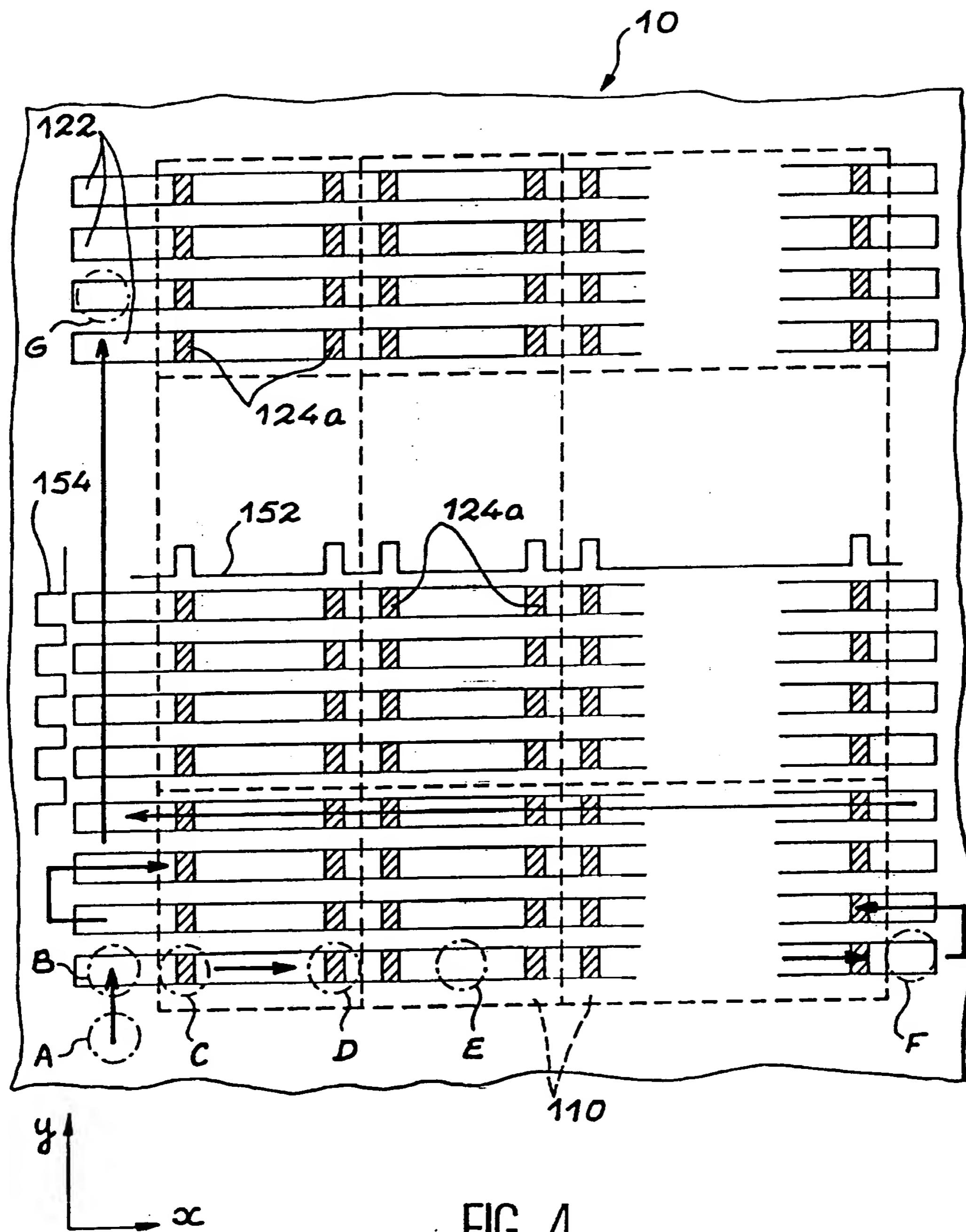


FIG. 4

## RAPPORT DE RECHERCHE

## PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement  
national

FA 564212

FR 9812438

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	WO 98 28623 A (GAMERA BIOSCIENCE) 2 juillet 1998  * abrégé * * page 5, ligne 19 - ligne 21 * * page 11, ligne 26 - ligne 29 * * page 13, ligne 25 - page 14, ligne 9 * * page 14, ligne 25 - ligne 27 * * page 15, ligne 8 - ligne 16 * * page 15, ligne 21 - page 17, ligne 5 * * page 17, ligne 11 - ligne 20 * * page 17, ligne 26 - page 18, ligne 9 * * page 21, ligne 24 - ligne 26 * * page 23, ligne 17 - ligne 21 * * page 24, ligne 11 - ligne 14 * * page 33, ligne 15 - page 34, ligne 4 * * figures IC,5D * * figures 6A,6B,6C * ---	1-3,6, 11-17, 19,23
A		4
Y		5,7-9
Y	WO 98 38490 A (BIODX) * page 10, ligne 7 - ligne 20 * * page 16, ligne 13 - page 17, ligne 22 * * page 18, ligne 6 - ligne 12 * * page 24, ligne 6 - ligne 8 * * page 29, ligne 4 - ligne 15 * * figures 1,2,9 * ---	5,9
A		1-3,6
		-/-
1	Date d'achèvement de la recherche 21 juin 1999	Examinateur Thomas, R.M.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement  
nationalFA 564212  
FR 9812438

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
Y	EP-0 640 826 A (BECTON DICKINSON) * colonne 1, alinéa 1 * * colonne 2, ligne 42 - colonne 3, ligne 1 * * colonne 4, ligne 42 - colonne 5, ligne 6 * * colonne 5, ligne 30 - colonne 6, ligne 2 * * colonne 6, ligne 56 - colonne 7, ligne 4 * * colonne 7, ligne 53 - colonne 8, ligne 16 * * colonne 8, ligne 46 - colonne 9, ligne 15 * * colonne 14, ligne 6 - ligne 26 * * figures 1A,1B,2-4,13 * ---	7,8
A	US 5 790 710 A (PRICE) * colonne 4, ligne 65 - colonne 5, ligne 25 * * colonne 5, ligne 33 - ligne 35 * * colonne 11, ligne 20 - ligne 26 * * figure 1 * ---	1-3
A	US 5 721 435 A (TROLL) * abrégé * * colonne 3, ligne 57 - ligne 65 * * colonne 4, ligne 25 - ligne 32 * * colonne 4, ligne 44 - colonne 5, ligne 18; figures 1-3 * ---	1-4
D,A	US 5 721 435 A (TROLL) * abrégé * * colonne 3, ligne 57 - ligne 65 * * colonne 4, ligne 25 - ligne 32 * * colonne 4, ligne 44 - colonne 5, ligne 18; figures 1-3 * ---	1,2,12, 13, 15-19, 21,22 -/-
1	Date d'achèvement de la recherche 21 juin 1999	Examinateur Thomas, R.M.
<b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b> X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement  
nationalFA 564212  
FR 9812438

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D, A	M. BELLIS ET AL.: "La puce ADN: un multi-réacteur de paillasse" MÉDECINE SCIENCES, vol. 13, no. 11, 1997, pages 1317-1324, XP002106721 ----	
D, A	A. MARSHALL ET AL.: "DNA chips: an array of possibilities" NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 16, janvier 1998, pages 27-31, XP002106722 ----	
DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)		
1	Date d'achèvement de la recherche 21 juin 1999	Examinateur Thomas, R.M.
<b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b> X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant